



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - UNICEUB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE – FACES
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

MAYARA ALVARENGA QUEIROZ

**O USO DA GENOTIPAGEM DE GRUPOS SANGUÍNEOS NA PRÁTICA
TRANSFUSIONAL**

BRASÍLIA
2013

MAYARA ALVARENGA QUEIROZ

**O USO DA GENOTIPAGEM DE GRUPOS SANGUÍNEOS NA PRÁTICA
TRANSFUSIONAL**

Trabalho de conclusão de curso,
apresentado em formato de artigo
científico ao UniCEUB como requisito
parcial para a conclusão do Curso de
Bacharelado em Biomedicina.

Orientador: Milton Rego de Paula Júnior

BRASÍLIA

2013

*A Deus; princípio, meio e fim.
Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.
A Ele a glória por toda eternidade.*

O uso da genotipagem de grupos sanguíneos na prática transfusional.

MAYARA ALVARENGA QUEIROZ*; MILTON REGO DE PAULA JÚNIOR**

Resumo

A determinação do perfil antigênico eritrocitário é de suma importância para receptores e doadores de sangue, principalmente para prevenção de aloimunização. Por muito tempo, os grupos sanguíneos têm sido definidos pelo simples método de hemaglutinação direto ou reverso. Apesar de demonstrar eficiência para o que lhe é proposta, algumas limitações inerentes a esta técnica restringem uma total segurança transfusional em determinadas situações. O conhecimento das bases genéticas dos grupos sanguíneos e os polimorfismos que os determinam, possibilitaram a definição dos grupos sanguíneos pela verificação dos genes que o codificam. Esse novo método, denominado genotipagem, tem grande aplicabilidade para pacientes politransfundidos, pacientes com anemia autoimune, risco de doença hemolítica do recém-nascido, tipagem de doadores, entre outros. Não obstante algumas limitações apresentadas pela técnica, ela é fundamentalmente promissora na era do diagnóstico molecular, para a qual toda a comunidade científica se encaminha.

Palavras-chave: Aloimunização. Hemaglutinação. Fenotipagem. Genotipagem.

*Graduanda do curso de Biomedicina, Centro Universitário de Brasília – UniCEUB, Brasília/DF

**Mestre em Patologia Molecular pela Universidade de Brasília – UnB. Professor do curso de Biomedicina, Centro Universitário de Brasília – UniCEUB, Brasília/DF. milton.junior@uniceub.br

1 Introdução

Os sistemas sanguíneos são determinados pela presença ou ausência de antígenos na membrana eritrocitária. Tais determinantes antigênicos representam uma variação hereditária de proteínas, glicoproteínas e glicolípídeos expostos na superfície da célula (DANIELS, 2005; CASTILHO; PELLEGRINO, 2004).

Os antígenos dos grupos sanguíneos são formados a partir da expressão de genes com no mínimo dois alelos, em uma relação de dominância e codominância. De fato, constituem um grupo de aloantígenos, por estarem presentes em alguns membros de uma espécie e em outros não, expressando uma variabilidade genética intraespecífica. Sendo assim, os grupos sanguíneos são essencialmente polimórficos e a base para esses polimorfismos são as diferentes mutações que podem ocorrer na sequência do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) (COSTA, 2011). Apesar de recombinações gênicas, deleções e inserções terem ocorrido ao longo da evolução dos genes codificadores dos sistemas de grupos sanguíneos, os polimorfismos existentes originam-se predominantemente de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) (DANIELS, 2005; WESTER *et al.*, 2005).

O conhecimento dos antígenos eritrocitários é fundamental na prática transfusional, uma vez que a exposição do indivíduo a antígenos não próprios, em uma transfusão de sangue não compatível, pode ocasionar a formação de aloanticorpos, em um processo chamado aloimunização (BAIOCHI; NARDOZZA, 2009).

Um efeito grave associado à transfusão é a hemólise do sangue transfundido, devido aos anticorpos pré-formados no plasma do receptor. Assim, a transfusão de sangue incompatível pode resultar em reação transfusional hemolítica imediata, que leva a morte do paciente ou em reação transfusional hemolítica tardia, por anticorpos não detectados em testes pré-transfusionais (POOLE; DANIELS, 2007; COSTA, 2011).

Considerando os riscos inerentes à transfusão, tem-se procurado reduzir ao mínimo as chances de formação de aloanticorpos antieritrocitários no receptor. A Portaria Nº 1.353 do Ministério da Saúde recomenda para pacientes que estão ou poderão entrar em esquema de transfusão crônica, a realização da fenotipagem para os antígenos eritrocitários dos sistemas ABO (A, B, AB, O), Rh (D, E, e, C, c),

Kell (K), Duffy (Fya e Fyb), Kidd (Jka e Jkb) e MNS (S e s), por serem os mais imunogênicos (BRASIL, 2011).

A metodologia clássica para a determinação dos antígenos eritrocitários e anticorpos dos grupos sanguíneos se baseia na fenotipagem pelo princípio da hemaglutinação direta ou reversa. A fenotipagem eritrocitária, apesar de ser o padrão ouro utilizado por décadas nos laboratórios de imunohematologia, apresenta limitações técnicas e clínicas. Diante disso, a genotipagem molecular tem se destacado na medicina transfusional, constituindo uma alternativa para suprir as deficiências fenotípicas e evitar reações transfusionais (CASTILHO, 2012; MARTINS *et al.*, 2009).

Os protocolos moleculares atualmente empregados na genotipagem de grupos sanguíneos englobam as técnicas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): PCR em tempo real, PCR alelo-específico (AS-PCR), PCR seguido por análises dos fragmentos com enzimas de restrição (PCR-RFLP) e, mais recentemente, a tecnologia de Microarranjos (DENOMME *et al.*, 2005; VELDHUISEN *et al.*, 2009).

O presente trabalho tem por objetivo realizar uma revisão bibliográfica acerca da determinação do perfil genético dos antígenos eritrocitários mais imunogênicos na prática transfusional.

2 Metodologia

A coleta de artigos foi realizada entre os meses de março a maio de 2013, nas seguintes bases de dados: Wiley Online Library, Pubmed, Scielo, MedLine e nas referências dos artigos selecionados.

Foram utilizadas as palavras-chaves “genotipagem de grupos sanguíneos”, “bases moleculares dos sistemas sanguíneos”, “aplicações da genotipagem de grupos sanguíneos”, “blood group genotyping”, “blood group genetics”, combinadas entre si, usadas em português e inglês para uma maior abrangência de informações.

Foram selecionados artigos de revisão e pesquisa, publicados entre os anos de 1983 a 2012.

3 Fenotipagem e suas Limitações

Por mais de um século, os grupos sanguíneos foram determinados pelo método clássico de aglutinação, baseado na pesquisa de antígenos presentes nas hemácias utilizando antissoros correspondentes (prova direta) ou na determinação de anticorpos presentes no soro/plasma do indivíduo utilizando hemácias fenotipadas (prova reversa). Essa técnica atendeu bem a comunidade transfusional por muito tempo, por constituir uma metodologia simples, que requer poucos equipamentos e quando realizada corretamente, tem sensibilidade e especificidade qualitativas apropriadas para o cuidado clínico de uma grande maioria de pacientes que necessitam de transfusão (AVENT, 2008; REID, 2009; DENOMME *et al.*, 2011).

Entretanto, a hemaglutinação apresenta certas limitações que restringem uma total segurança transfusional em determinadas situações. Dentre algumas limitações técnicas, destacam-se sua interpretação essencialmente subjetiva, alto custo dos reagentes (especialmente soros raros), indisponibilidade de antissoros comerciais para certos antígenos, necessidade de utilização de soros totalmente confiáveis e dispendiosidade para determinação de muitos antígenos. Adicionalmente, limitações clínicas, como fenotipagem de pacientes transfundidos recentemente ou politransfundidos, distinção de auto e aloanticorpos, prevenção confiável da doença

hemolítica do recém-nascido, determinação total da zigosidade RHD e transfusão correta de pacientes aloimunizados, fazem dessa técnica um meio insuficiente para suprir todas as vertentes da prática transfusional (KARPASITOU *et al.*, 2008; REID, 2009; COSTA, 2011).

Com o objetivo de superar tais limitações, as técnicas moleculares começaram a ser introduzidas na imunohematologia. De acordo com a ISBT (*International Society for Blood Transfusion*), atualmente são descritos 30 sistemas de grupos sanguíneos e todos já foram clonados e sequenciados, com exceção do sistema P (DANIELS *et al.*, 2009). A genotipagem detecta a sequência de DNA responsável pela expressão dos antígenos eritrocitários, enquanto os testes de hemaglutinação se restringem a avaliar o produto dos genes responsáveis pelos grupos sanguíneos. Portanto, essa técnica se torna totalmente viável para casos nos quais a hemaglutinação não apresenta eficácia, prevenindo transfusões incompatíveis e permitindo um melhor uso das unidades de hemocomponentes (DANIELS, 2005; CASTILHO, 2009; MARTINS *et al.*, 2009).

Com o conhecimento das bases genéticas dos polimorfismos dos grupos sanguíneos foi possível o desenvolvimento de diversos protocolos para deduzir o fenótipo eritrocitário utilizando técnicas de biologia molecular (FLEGEL; DENOMME, 2008; MARTINS *et al.*, 2009).

4 Princípios Genéticos dos Principais Grupos Sanguíneos na Prática Transfusional

O isolamento e sequenciamento gênico possibilitaram a identificação de diversas formas polimórficas responsáveis pelas variações fenotípicas encontradas nos indivíduos. Para ser considerado polimorfismo, essas variantes genéticas precisam estar presentes na população em uma frequência maior que 1%. Entre os polimorfismos que dão origem aos grupos sanguíneos, predominam-se um ou mais polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs), os quais a diferença entre indivíduos da mesma espécie ou entre cromossomos homólogos do mesmo indivíduo se

baseam na variação de apenas um nucleotídeo na sequência de DNA (SCHAFER; HAWKINS, 1998; DANIELS, 2005; HINDS *et al.*, 2005; DANIELS *et al.*, 2009).

Outros tipos de polimorfismos também caracterizam alguns sistemas sanguíneos transfusionalmente significativos. No sistema Rh, por exemplo, uma deleção de todo o gene dará origem ao fenótipo D-negativo, comum em populações caucasianas. Outros fenótipos Rh variantes, surgem de rearranjos do RHCE e/ou RHD dispostos *in tandem*; mutação pontual que causa alterações de aminoácidos com consequente perda de alguns epítomos e/ou expressão de antígeno de baixa incidência; mutações sem sentido e deleções de nucleotídeos que causam um *stop codon* prematuro. No sistema MNS, a deleção de toda a região codificadora do gene *GYPB* resulta no fenótipo S-s-U- em africanos e recombinações intergênicas que incluem o gene *GYP* dá origem a proteínas híbridas (AVENT; REID, 2000; BATISSOCO; NOVARETTI, 2003; DANIELS, 2005; ANSTEE, 2009; BONIFÁCIO; NOVARETTI, 2009).

Os sistemas de importância transfusional determinados pela Portaria Nº 1.353 do Ministério da Saúde, compreende em sua maioria apenas um gene, dentre os quais se excetuam o sistema Rh que envolve dois genes e o sistema MNS que envolve três, todos com localizações cromossômicas conhecidas. Em cada sistema, um par de alelos idênticos (homozigotos) ou dois alelos diferentes (heterozigotos) são inerentes no genoma. Os genes que codificam os antígenos de grupos sanguíneos podem ser divididos em dois grupos: aqueles os quais os produtos primários dos genes são antígenos protéicos e aqueles que codificam glicosiltransferases responsáveis pela síntese de antígenos a partir de hidratos de carbono dos produtos de genes secundários (YAMAMOTO, 2000; BLUMENFELD *et al.*, 2004; DANIELS, 2005).

O conhecimento de toda a fundamentação genética dos grupos sanguíneos pode ser utilizado como alvo diagnóstico para a conclusão de alguns casos relevantes na prática transfusional (REID; DENOMME, 2011).

5 Aplicações da Genotipagem de Grupos Sanguíneos

5.1 Pacientes Politransfundidos

O risco de aloimunização é significativamente alto para pacientes com qualidade de vida dependente de transfusão crônica. Geralmente, pacientes com anemia falciforme, talassemia, síndrome mielodisplásica, e outras anemias congênitas ou adquiridas, necessitam de suporte transfusional a longo prazo. Tais pacientes podem apresentar reações hemolíticas tardias, com destruição extravascular dos eritrócitos, devido aos anticorpos não detectados nos testes pré-transfusoriais (MURAO; VIANA, 2005; POOLE; DANIELS, 2007; COSTA, 2011).

A taxa de incidência de aloimunização em pacientes politransfundidos varia de 8 a 76%, implicando fatores como idade do paciente, histórico de gravidez, número e tempo de transfusões, diagnóstico clínico e tratamento, fatores genéticos relacionados à resposta antigênica e diferenças raciais entre doadores e receptores (POOLE; DANIELS, 2007; AVENT, 2008; NATUKUNDA, 2012).

Após uma transfusão com um antígeno irregular incompatível, a resposta imunológica primária pode levar semanas ou meses para produzir um anticorpo em níveis detectáveis pelos testes sorológicos. Adicionalmente, o título dos anticorpos decai com o decorrer do tempo, atingindo níveis também não detectáveis. Com isso, muitos aloanticorpos não são descobertos, pelo fato das pesquisas referentes à aloimunização eritrocitária normalmente serem realizadas somente antes de um novo evento transfusional. Se futuramente o paciente receber um antígeno estranho para o qual já esteja sensibilizado, sua memória imunológica desencadeará uma resposta imune secundária mais rápida que a anterior e pode ocasionar reação hemolítica grave (SCHONEWILLE *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2007; THAKRAL, 2008; ALVES *et al.*, 2012).

Na tentativa de minimizar o risco de aloimunização em pacientes politransfundidos, geralmente opta-se por bolsas com o maior número de antígenos negativos possíveis. Porém seu fornecimento é bastante restrito para atender todos os pacientes dependentes de transfusão crônica, considerando que a fenotipagem

de um grande número de doadores para todos os antígenos se torna inviável por métodos sorológicos (REID; DENOMME, 2011; ZALPURI *et al.*, 2012).

Uma das maiores limitações no banco de sangue é que após recebimento de recentes ou múltiplas transfusões, as hemácias dos doadores persistem na circulação periférica durante algum tempo, o que dificulta a diferenciação de fenótipos originais do paciente, justamente por essa população mista de células. Assim, a identificação correta do perfil antigênico será prejudicada, o que impossibilita uma seleção correta do hemocomponente a ser transfundido e aumenta o risco de aloimunização (REID, 2003; CASTILHO, 2008). Vários procedimentos foram desenvolvidos para separação das hemácias do doador e receptor, utilizando a densidade da amostra. As hemácias de menor densidade eram consideradas reticulócitos do paciente, mas nem sempre essa metodologia permitia a determinação fiel do fenótipo (REID, 1983; ROZMAN *et al.*, 2000).

A genotipagem de grupos sanguíneos constitui uma alternativa de grande relevância para pacientes politransfundidos com casos fenotípicos inconclusivos ou de difícil resolução. Uma das grandes preocupações de sua realização consistia na presença de leucócitos do doador após a transfusão. Entretanto, por meio de vários estudos, foi demonstrado que a presença destes microquimerismos não interfere no procedimento, se também forem mantidas as condições de coleta do sangue, filtração e/ou desleucotização (REID *et al.*, 2000a; ROZMAN *et al.*, 2000; CASTILHO *et al.*, 2002).

Outras fontes de obtenção de DNA incluem procedimentos não invasivos de coleta de células epiteliais bucais e/ou do sedimento urinário. No entanto, é importante a observação do histórico médico do paciente, pois alguns tratamentos, como o transplante de células progenitoras e transplante de rins, podem levar ao risco de uma extração de diferentes materiais genéticos (RIOS *et al.*, 1999; REID *et al.*, 2000a; REID, 2003; REID; DENOMME, 2011).

A determinação do genótipo é extremamente útil não só para a prevenção de aloimunização, como também para pacientes que já tenham produzido aloanticorpos, pois a identificação de seu provável fenótipo direcionará uma melhor seleção de hemácias antígeno-negativo (REID, 2003; CASTILHO *et al.*, 2004).

5.2 Pacientes com Anemia Hemolítica Autoimune (AHAI)

Os pacientes com AHA, cujas hemácias estão revestidas com anticorpos da classe IgG e conseqüentemente com positividade no Teste da Antiglobulina Direta (TAD ou COOMBS Direto), são dificilmente fenotipados com exatidão. O TAD se baseia na ligação da antiglobulina humana presente no reagente na fração dos possíveis anticorpos ligados previamente a membrana eritrocitária, provocando uma aglutinação, já que os anticorpos primariamente ligados são incapazes de promover tal reação (REID, 2003; CASTILHO *et al.*, 2004; AVENT *et al.*, 2007).

A indisponibilidade dos anticorpos de aglutinação direta para o TAD e a insuficiência de tratamentos químicos para remoção do IgG das hemácias, contribuem para as grandes limitações da metodologia sorológica. A eluição das hemácias constitui em uma técnica baseada no princípio de reversão das forças de atração que mantém antígenos e anticorpos ligados, utilizando solventes como o difosfato de cloroquina, ou soluções que alteram o pH, como a glicina ácida. No entanto, alguns antígenos dos grupos sanguíneos são sensíveis a esses tratamentos químicos, como por exemplo, o antígeno do sistema Kell, que é inativado por determinados ácidos (REID, 2004; REID; DENOMME, 2011).

Nesses casos, a genotipagem pode auxiliar na determinação correta do perfil antigênico do paciente, distinguir aloanticorpos de autoanticorpos e possibilitar uma transfusão o mais compatível possível. Com a seleção mais precisa de doadores compatíveis, é possível a prevenção de aloimunização e redução de futuras reações hemolíticas (REID *et al.*, 2000a; CASTILHO *et al.*, 2001; CASTILHO *et al.*, 2004).

5.3 Identificação de risco para Doença Hemolítica do Recém-Nascido (DHRN)

Os testes sorológicos, hemaglutinação e titulação de anticorpos antieritrocitários, oferecem somente uma indicação indireta sobre o risco e a gravidade da DHRN. A causa mais comum desta doença é a aloimunização contra o antígeno RhD durante a gestação e embora outros antígenos do sistema Rh e de outros grupos sanguíneos possam originá-la, este permanece como o mais

imunogênico. A determinação pré-natal do status RhD fetal é desejável em gestações que a mãe for RhD negativa e seu soro conter aloanticorpos IgG associados com DHRN, e quando o status do pai para o antígeno correspondente é heterozigoto, indeterminado, ou não disponíveis para testes (AVENT *et al.*, 2000; CASTILHO *et al.*, 2004; VAN WAMELEN *et al.*, 2007).

O DNA fetal pode ser encontrado em células amnióticas, amostras de vilosidades coriônicas e mais recentemente relatado no plasma materno. Já foi estabelecido que mesmo em um número baixo de cópias de DNA fetal livre no plasma materno (como por exemplo, 35 cópias/ml) pode ser utilizado como alvo para a genotipagem não invasiva do feto (FINNING *et al.*, 2007; SETO *et al.*, 2007; MADDOCKS *et al.*, 2009).

A origem deste DNA fetal ainda não foi totalmente estabelecida. Sabe-se que células fetais hematopoiéticas nucleadas são transferidas no tráfico celular materno-fetal através da placenta e circulam no sangue materno, onde uma grande parte sofre apoptose. No entanto, a apoptose por si só não explica a quantidade de material genético do feto encontrado no sangue materno. O DNA fetal também já foi detectado no soro materno logo 18 dias após a concepção em pacientes submetidas à reprodução assistida, durante um período em que os primeiros capilares são observados no mesênquima das vilosidades secundárias placentárias, porém antes do estabelecimento da circulação fetal (BIANCHI *et al.*, 1999; MULDER *et al.*, 2000; VAN WIJK *et al.*, 2000; GUILBERT *et al.*, 2003; AVENT *et al.*, 2009).

As fontes mais prováveis de DNA fetal no plasma materno são de trofoblastos vilosos do compartimento fetal da placenta. Esses podem ser liberados por meio da interface materno-fetal e rapidamente destruídos pelo sistema imune materno ou sofrerem apoptose no próprio compartimento (LEVY *et al.*, 2000; POON *et al.*, 2001; BIANCHI, 2004).

A estratégia de tipagem do DNA de um feto em risco de DHRN deve ser para detectar um gene, mesmo que seu produto não seja expresso na membrana eritrocitária, e deve incluir a detecção de alelos comumente silenciados. Os resultados devem ser cautelosamente avaliados para o risco de possíveis contaminações por DNA materno. Relatos evidenciam que o tamanho dos fragmentos de DNA fetal no plasma materno é de 145 a 201 pb, enquanto os

fragmentos maternos são consideravelmente maiores (CHAN *et al.*, 2004; REID, 2009; REID; DENOMME, 2011).

Na genotipagem RhD fetal deve-se realizar uma amplificação de um gene controle por meio de PCR, para comprovar a recuperação de DNA a partir do plasma materno e validar os testes. Com o objetivo de controlar a reação de PCR para RhD, pode-se incluir amostras de DNA genômico RhD positivo e negativo ou DNA extraído de plasma de gestantes com feto RhD positivo (CHAN *et al.*, 2004; DANIELS *et al.*, 2004; SCHMIDT *et al.*, 2011).

Uma alternativa para diferenciação da origem do DNA é avaliar um gene ausente na mãe, como o SRY, em casos de fetos do sexo masculino. Na detecção de DNA feminino, podem ser empregados 8 a 11 marcadores altamente polimórficos, que acusam marcadores paternos no plasma materno, quando comparados ao DNA materno. Portanto, se há pelo menos um sinal positivo, o DNA analisado é realmente de origem fetal. Outra possibilidade é a análise do promotor do gene supressor de tumor 'RASSF1A', que é hipermetilado na placenta e hipometilado em células sanguíneas maternas. Utiliza-se uma enzima de restrição sensível à metilação, e se detectar as sequências hipermetiladas do gene no plasma de gestantes RhD negativo, confirma-se a presença de DNA fetal (LO *et al.*, 1997; CHAN *et al.*, 2004; CHAN *et al.*, 2006; DENG *et al.*, 2006; SCHMIDT *et al.*, 2011).

A concentração de DNA fetal livre aumenta com o tempo de gestação, assim como sua proporção em algumas gestações com complicações, como em casos de danos placentários, pré-eclâmpsia e aneuploidia. Além disso, gestações anteriores não dificultam a genotipagem, pois a meia vida do DNA fetal é de 16 horas após parto cesário e de 10 a 100 horas após parto normal, exceto em casos de doença hepática materna (BROJER *et al.*, 2005; AVENT *et al.*, 2009; SCHMIDT *et al.*, 2011).

As análises de PCR para previsão da tipagem D do feto são baseadas na detecção da presença ou ausência de porções específicas do RhD. Também é de grande valor clínico o estabelecimento do genótipo Kell, considerando que o anti-k é atualmente responsável por cerca de 10% dos casos de anemia em recém-nascidos. Uma parte importante da tipagem por DNA de um feto é a obtenção do histórico materno, para determinar se a mãe foi submetida a procedimentos médicos como

inseminação artificial, fertilização *in vitro* ou se a mãe é substituta (LEE *et al.*, 2000; LEE, 2007; REID, 2007).

Por não constituir um método invasivo, a genotipagem RhD fetal não oferece nenhum risco clínico à mãe ou ao feto. Seu uso permite um melhor acompanhamento de gestantes RhD negativo, acesso à profilaxia antenatal e até redução do custo de atendimento para casos considerados de risco (SCHMIDT *et al.*, 2011).

5.5 Genotipagem de Doadores

A genotipagem de doadores para os sistemas de grupos sanguíneos clinicamente relevantes oferece benefícios imediatos e futuros para assistência do paciente. O custo crescente de reagentes comerciais, a indisponibilidade de reagentes para determinados grupos sanguíneos, anticorpos fracamente reativos para uma tipagem de segurança e o trabalho intensivo nos testes de hemaglutinação, fazem da fenotipagem um método dispendioso e inviável para a grande escala de doadores (REID, 2003; CASTILHO *et al.*, 2004; AVENT, 2008; VELDHUISEN *et al.*, 2009).

Com a previsão do fenótipo dos doadores, podem-se aumentar os estoques de hemocomponentes antígeno-negativo e de amostras com finalidade para criação de painéis de reagentes de identificação de anticorpos, úteis em casos que reagentes comerciais não estão disponíveis (ex: anti-Do^a/Do^b, anti-VS/V, anti-Js^a) ou são fracamente reativos (Fy^b e Kn^a/Kn^b, que auxiliam na identificação de anticorpos). Com a genotipagem do doador, a presença de um gene cujo produto não é expresso sobre a superfície da célula, poderia ser falsamente definida como antígeno-positivo e embora significasse perda de um doador antígeno-negativo, não comprometeria a segurança transfusional. No sistema Kell, por exemplo, a homozigotia para um alelo silenciado resultará em um fenótipo nulo (*null*) e ainda assim o paciente poderá produzir anticorpos para a proteína ausente em suas hemácias (STORRY *et al.*, 2007; REID, 2009; REID; DENOMME, 2011).

As plataformas de análise de DNA constituem metodologias de elevado rendimento, que realizam simultaneamente vários ensaios sobre uma mesma amostra, viabilizando a previsão de vários tipos de antígenos para um grande número de doadores. Os resultados são analisados pelo computador e as informações armazenadas para criação de um extenso banco de dados (CASTILHO *et al.*, 2004; AVENT, 2008; VELDHUISEN *et al.*, 2009; REID; DENOMME, 2011).

6 Limitações da Genotipagem

Apesar das vantagens e aplicações da identificação genotípica dos grupos sanguíneos, existem algumas limitações que sugerem a necessidade de uma interpretação mais aprofundada para a tomada de decisões clínicas importantes (REID, 2007; REID; DENOMME, 2011).

Alguns eventos genéticos causam discrepâncias entre genótipo e fenótipo de um indivíduo, nos quais a proteína resultante de um gene não é expressa na superfície celular. Esses eventos podem incluir alterações no gene que afetam sua transcrição (mutações pontuais em elementos regulares, mutação em sítios de *splicing*, *stop códon* prematuro), ausência da proteína de interação necessária para a expressão do antígeno, *crossing over* e outros rearranjos gênicos. Dado o grande número de eventos genéticos conhecidos por silenciar ou enfraquecer a expressão de antígenos codificados por um alelo, levará um longo tempo até que todas as alterações nucleotídicas relevantes sejam determinadas para todos os grupos sanguíneos de diversas etnias. É pela possibilidade de envolvimento da herança de um alelo nulo, um gene híbrido ou uma nova variante, que se torna indispensável uma maior precaução na utilização dos métodos moleculares para investigação de anticorpos (REID *et al.*, 2000b; CASTILHO, 2012).

Os Fenótipos nulos, como Rh $_{null}$, K0, Fy(a-b-), Jk(a-b-), LW(a-b-), possuem um gene aparentemente normal, porém a proteína carreadora do antígeno não é expressa. Outros exemplos, incluem mudanças no gene XK que enfraquecem a expressão antigênica do sistema Kell e mudanças no gene codificador da glicoproteína Rh (Rh50) que impedem a interação do RhD e RhCE na membrana

eritrocitária, e assim os antígenos Rh não são expressos. Há também proteínas expressas em baixo número de cópias, sendo de difícil detecção, como o antígeno Fyx. Os antígenos previstos para serem ausentes devem ser confirmados por hemaglutinação, utilizando anticorpo apropriado (no caso de doadores) ou pela prova cruzada para detecção de incompatibilidade (REID *et al.*, 2000b; BLUMENFELD *et al.*, 2004; REID, 2007; REID, 2009; DENOMME, 2011; COSTA, 2011).

Outra limitação é que nem todos os polimorfismos de grupos sanguíneos podem ser facilmente analisados. Em alguns sistemas, um grande número de alelos codifica um fenótipo (como ABO, Rh e o fenótipo nulo em muitos grupos), alguns alelos têm grandes deleções (Ge-) ou genes híbridos (MNS e Rh), e ainda há a possibilidade de nem todos os alelos em todas as populações étnicas serem conhecidos. Diante desses fatos, faz-se necessária uma análise mais abrangente de diferentes grupos étnicos para um estabelecimento fiel entre genótipo e fenótipo (REID, 2007; REID; DENOMME, 2011).

As técnicas de PCR são propensas a diferentes tipos de erros. Considerando sua extrema sensibilidade, o risco de contaminação é elevado, podendo gerar resultados falso-positivos. A técnica deve ser otimizada para detectar sequências de DNA do paciente, comparando amostras de sangue com outras fontes de DNA. Há também um maior gasto de tempo em sua execução e custo elevado, o que constitui um dos maiores impedimentos para sua implantação (PELLEGRINO *et al.*, 2001).

7 Considerações Finais

No momento atual, a política de transfusão tem como objetivo primordial a prevenção de aloimunização e reações hemolíticas, transfusionais ou por gestações anteriores. Na rotina de tipagem ABO e Rh de doadores, os testes de hemaglutinação são relativamente simples, rápidos e de menor custo. No entanto, a análise molecular já vem sendo utilizada na resolução de discrepâncias de fenótipos fracos ou raros. A genotipagem atende com grande eficiência a seleção de hemocomponentes de maior segurança para o paciente, além de constituir um importante diagnóstico sanguíneo pré-natal. As técnicas de biologia molecular apresentam um custo elevado em relação à sorologia convencional. Entretanto, na prevenção da aloimunização, os gastos com investigações sorológicas avançadas quando este evento já estiver acontecido se reduzirá.

Diante do exposto, é evidente a crescente progressão do diagnóstico molecular na medicina transfusional, considerando a elevação do padrão de segurança, o aumento no recrutamento de doadores e a personalização de toda a estrutura para adaptação dos produtos sanguíneos às necessidades clínicas do paciente.

The use of blood group genotyping in transfusional practice.

Abstract

The determination of antigenic erythrocyte profile is of great importance to blood receivers and donors, mainly to prevent alloimmunization. For a long time, blood groups have been defined by the simple method of direct or reverse hemagglutination. Although it shows efficiency for what it is proposed, some limitations of this technique restricts a completely safe transfusion in certain situations. The knowledge of the genetic basis of blood groups and the polymorphisms that determine them, allowed the definition of blood groups by the verification of the genes that encode them. This new method, called genotyping, has great applicability for politransfused patients, patients with autoimmune anemia, risk of Newborn Hemolytic Disease, donors typing, among others. Despite some limitations presented by this technique, it is fundamentally promising in the era of molecular diagnosis for which the entire scientific community is heading.

Keywords: Alloimmunization. Hemagglutination. Phenotyping. Genotyping.

Referências Bibliográficas

ALVES, V.M. *et al.* Pesquisa de aloimunização após transfusão de concentrados de hemácias em um estudo prospective. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 34, n. 3, p. 206-11, 2012.

ANSTEE, D.J. Red cell genotyping and the future of pretransfusion testing. **Blood**, v. 114, p. 248-256, 2009.

AVENT, N.D. *et al.* Cell-free fetal DNA in the maternal serum and plasma: current and evolving applications. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 21, p. 175-9, 2009.

AVENT, N.D. *et al.* Prenatal determination of fetal blood group status. **Vox Sanguinis**, v. 78, p. 155-162, 2000.

AVENT, N.D. *et al.* The BloodGen project: toward mass-scale comprehensive genotyping of blood donors in the European Union and beyond. **Transfusion**, v. 47, p. 40S-46S, 2007.

AVENT, N.D. Large-scale Blood Group Genotyping - Clinical Implications. **British Journal of Haematology**, v. 144, p. 3-13, 2008.

AVENT, N.D.; REID M.E. The Rh blood group system: a review. **Blood**, v. 95, p. 375-387, 2000.

BAIOCHI, E.; NARDOZZA, L.M.M. Aloimunização. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 6, p. 3111-9, 2009.

BATISSOCO, A.C.; NOVARETTI, M.C.Z. Aspectos moleculares do Sistema Sangüíneo ABO. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 25, n. 1, p. 47-58, 2003.

BIANCHI, D.W. Circulating fetal DNA: Its Origin and Diagnostic Potential – a review. **Placenta**, v. 25, p. 93-101, 2004.

BIANCHI, D.W. *et al.* Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. **British Journal of Haematology**, v. 105, p. 574-583, 1999.

BLUMENFELD, O.O.; PATNAIK, S.K. Allelic genes of blood group antigens: a source of Human Mutations and cSNPs Documented in the Blood Group Antigen Gene Mutation Database. **Human Mutation**, v. 23, p. 8-16, 2004.

BONIFÁCIO, S.L.; NOVARETTI, M.C.Z. Funções biológicas dos antígenos eritrocitários. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 2, p. 104-111, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria do Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos**. Brasília: 2011. 113 p.

BROJER, E. *et al.* Noninvasive Determination of Fetal RHD Status by Examination of Cell-free DNA in Maternal Plasma. **Transfusion: Warsaw**, v. 45, n. 9, p. 1473-80, 2005.

CASTILHO, L. Applying molecular immunohematology discoveries to daily transfusion practice. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 34, n. 3, p. 175-87, 2012.

CASTILHO, L. *et al.* Blood group genotyping for the management of patients with "warm" antibody-induced hemolytic anemia. **Transfusion Clinique and Biologique**, v. 8(S), p. 166S, 2001.

CASTILHO, L. *et al.* DNA-based typing for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. **Transfusion**, v. 42, p. 232-238, 2002.

CASTILHO, L. Imuno-hematologia molecular: onde estamos e para onde vamos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 4, p. 216-217, 2009.

CASTILHO, L. O futuro da aloimunização eritrocitária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, p. 4, 2008.

CASTILHO, L.; PELLEGRINO, J.J. Blood Group Genotyping. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 2, p. 135-140, 2004.

CHAN, K.C. *et al.* Hypermethylated RASSF1A in Maternal Plasma: Universal fetal DNA Marker that Improves the Reliability of Noninvasive Prenatal Diagnosis. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 22, p. 11-18, 2006.

CHAN, K.C. *et al.* Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 88-92, 2004.

COSTA, D.C. **Genotipagem de Grupos Sanguíneos no Suporte Transfusional para Pacientes com Anemia Falciforme**. 2011. 128 f. Tese (Mestrado em Clínica Médica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2011.

DANIELS, G. *et al.* Fetal blood group genotyping from DNA plasma: an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn (Review). **Vox Sanguinis**, v. 87, n. 4, p. 225-32, 2004.

DANIELS, G. *et al.* International Society of Blood Transfusion Committee on Terminology for Red Blood Cell Surface Antigens: Macao report. **Vox Sanguinis**, v. 96, p. 153-156, 2009.

DANIELS, G. The molecular genetics of blood group polymorphism. **Transplant Immunology**, v. 14, n. 3-4, p. 143-153, 2005.

DENG, Z. *et al.* Noninvasive genotyping of 9 Y-chromosome specific STR loci using circulatory fetal DNA in maternal plasma by multiplex PCR. **Prenatal Diagnostic**, v. 26, p. 362-368, 2006.

DENOMME, G.A.; FLEGEL, W.A. Applying molecular immunohematology discoveries to standards of practice in blood banks: now is the time. **Transfusion**, v. 48, p. 2461-2475, 2008.

DENOMME, G.A.; JOHNSON, S.T.; PIETZ, B.C. Mass-scale red cell genotyping of blood donors. **Elsevier**, v. 44, p. 93-99, 2011.

DENOMME, G.A.; VAN OENE M. High-throughput multiplex single-nucleotide polymorphism analysis for red cell and platelet antigen genotypes. **Transfusion**, v. 45, p. 660-6, 2005.

FINNING, K. *et al.* Fetal genotyping for the K (Kell) and Rh C, c, and E blood groups on cell-free fetal DNA in maternal plasma. **Transfusion**, v. 47, p. 2126-2133, 2007.

GUIBERT, J. *et al.* Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real time PCR in early pregnancy after assisted reproductive techniques. **Human Reproduction**, v. 18, p. 1733-1736, 2003.

HINDS, D.A. *et al.* Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. **Science**, v. 9, p. 307-1072, 2005.

KARPASITOU, K. *et al.* Blood group genotyping for Jk^a/Jk^b, Fy^a/Fy^b, S/s, K/k, Kp^a/Kp^b, Js^a/Js^b, Co^a/Co^b, and Lu^a/Lu^b with microarray beads. **Transfusion**, v. 48, p. 505-512, 2008.

LEE, S. The value of DNA analysis for antigens of the Kell and Kx blood group systems. **Transfusion**, v. 47, p. 32S-39S, 2007.

LEE, S.; RUSSO, D.; REDMAN, C.M. The Kell blood group system: Kell and XK membrane proteins. **Seminars Hematology**, v. 37, p. 113-210, 2000.

LEVY, R.; NELSON, D.M. To be, or not to be, that is the question. Apoptosis in human trophoblast. **Placenta**, v. 21, p. 1-13, 2000.

LO, Y.M. *et al.* Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. **Lancet**, v. 7, p. 350-485, 1997.

MADDOCKS, D.G. *et al.* The SAFE project: towards non-invasive prenatal diagnosis. **Biochemical Society Transactions**, v. 37, p. 460-465, 2009.

MARTINS, M.L. *et al.* Uso da genotipagem de grupos sanguíneos na elucidação de casos inconclusivos na fenotipagem eritrocitária de pacientes atendidos na Fundação Hemominas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 4, p. 252-259, 2009.

MULDERS, M.A.M.; VAN VUGT, J.M.G.; OUDEJANS, C.B.M. Detection of apoptotic fetal cells in plasma of pregnant women. **Clinical Chemistry**, v. 46, p. 729-731, 2000.

MURAO, M.; VIANA, M.B. Risk factors for alloimmunization by patients with sickle cell disease. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 675-682, 2005.

NATUKUNDA, B. Red blood cell alloimmunization and antigen matching in sickle cell disease – the African perspective. **International Society of Blood Transfusion**, v. 7, p. 129-133, 2012.

PELLEGRINO, J.J. *et al.* Blood Group Genotyping in a Population of Highly Diverse Ancestry. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 15, p. 8-13, 2001.

POOLE, J.; DANIELS, G. Blood Group Antibodies and Their Significance in Transfusion Medicine. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 21, p. 58-71, 2007.

POON, L.L.M.; LO, Y.M.D. Circulating fetal DNA in maternal plasma. **Clinica Chimica Acta**, v. 313, p. 151-155, 2001.

REID, M. Overview of molecular methods in immunohematology. **Transfusion**, v. 47, p. 10S-16S, 2007.

REID, M.E. Applications of DNA-based assays in blood group antigen and antibody identification. **Transfusion**, v. 43, p. 1.748-1.757, 2003.

REID, M.E. *et al.* DNA from blood samples can be used to genotype patients how have recently received a transfusion. **Transfusion**, v. 40, p. 1-6, 2000a.

REID, M.E. Transfusion in the age of molecular diagnostics. **American Society of Hematology**, v. 1, p. 171-177, 2009.

REID, M.E.; DENOMME, G.A. DNA-Based Methods in the Immunohematology Reference Laboratory. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 44, n. 1, p. 65-72, 2011.

REID, M.E.; LOMAS-FRANCIS, C. Blood Group Antigen FactsBook. 2nd edn. **San Diego: AcademicPress**; 2004.

REID, M.E.; RIOS, M.; YAZDANBAKHS, K. Applications of molecular biology techniques to transfusion medicine. **Seminars in Hematology**, v. 37, p. 166-176, 2000b.

REID, M.E.; TOY, P.T. Simplified method for recovery of autologous red blood cells from transfused patients. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 79, p. 364-6, 1983.

RIOS, M. *et al.* DNA from urine sediment or buccal cells can be used for blood group molecular genotyping. **Immunohematology**, v. 15, p. 61-65, 1999.

ROZMAN, P.; DOVE, T.; GASSNER, C. Differentiation of autologous ABO, RHD, RHCE, Kell, JK, and FY blood group genotypes by analysis of peripheral blood samples of patients who have recently received multiple transfusions. **Transfusion**, v. 40, p. 936-942, 2000.

SANTOS, F.W. *et al.* Post-transfusion red alloimmunization in patients with acute disorders and medical emergencies. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 4, p. 369-72, 2007.

SCHAFER, A.; HAWKINS, J.R. DNA variation and the future of human genetics. **Nature Biotechnology**, v. 16, p. 33-39, 1998.

SCHMIDT, L.C. *et al.* Genotipagem RhD fetal não invasiva no acompanhamento de gestantes RhD negativo. **Femina**, v. 39, p. 338-344, 2011.

SCHONEWILLE, H. *et al.* Red blood cell alloantibodies after transfusion: factors influencing incidence and specificity. **Transfusion**, v. 46, n. 2, p. 250-655, 2006.

SETO, E. *et al.* Predictive blood group genetics in hemolytic disease of the fetus and newborn: a 10-year review of a laboratory evaluation of amniotic fluid derived DNA. **Prenatal Diagnostics**, v. 27, p. 1017-1023, 2007.

STORRY J.R.; OLSSON, M.L.; REID, M.E. Application of DNA analysis to the quality assurance of reagent red blood cells. **Transfusion**, v. 47, p. 73S-78S, 2007.

THAKRAL, B. *et al.* Red cell alloimmunization in a transfused patient population: a study from a tertiary care hospital in north India. **Hematology**, v. 13, n. 5, p. 313-8, 2008.

VAN WAMELEN, D.J. *et al.* Obstetric history and antibody titer in estimating severity of Kell alloimmunization in pregnancy. **Obstetrics and Gynecology**, v. 109, p. 1093-1098, 2007.

VAN, W.I.J. *et al.* Detection of apoptotic fetal cells in plasma of pregnant women. **Clinical Chemistry**, v. 46, p. 729-731, 2000.

VELDHUISEN, B.; VAN DER SCHOOT, C.E.; DE, H.M. Blood group genotyping: from patient to high-throughput donor screening. **Vox Sanguinis**, v. 97, p. 198-206, 2009.

WESTER, E. *et al.* Genetic basis of the K0 phenotype in the Swedish population. **Immunohematology**, v. 45, p. 545-549, 2005.

YAMAMOTO, F. Molecular genetics of ABO. **Vox Sanguinis**, v. 78, p. 91-103, 2000.

ZALPURI, S.; ZWAGINGA, J.J.; VAN DER BOM, J.G. Risk Factors for Alloimmunisation after red blood Cell Transfusions (R-FACT): a case cohort study. **BJM Open**, v. 2, p. 1-7, 2012.